

## ヨモギのヒト培養細胞に及ぼす作用と抗酸化活性

益岡 典芳・川西 秀樹\*・田中 寿美子\*・石原 浩二

浜田 博喜

岡山理科大学理学部臨床生命科学科

\*岡山理科大学大学院理学研究科総合理学専攻

(2006年9月13日受付、2006年11月6日受理)

### 要旨

ヨモギを50%エタノール水で抽出して、ヒト培養細胞に及ぼす影響を調べた。抽出液は培養細胞の増殖を著しく抑制する細胞毒性を示した。この作用は細胞形態変形作用を伴うが、細胞増殖抑制作用によることを明らかにした。また、この作用は、ヨモギを加熱処理することで著しく減少した。DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) を使ったラジカルスカベンジング活性の測定ではヨモギは強い活性を示したが、この活性は加熱処理してもほとんど変化しなかった。これらより、ヨモギは加熱加工すると細胞毒性が減少し、高いラジカルスカベンジング活性を持つ優れた食材になることが示唆された。

### 1 緒言

ヨモギ (*Artemisia princeps*) の葉は艾葉 (がいよう) といい、消炎、止血などの作用を持つ、乾燥した葉は艾 (もぐさ) として灸に利用されている。従ってその成分については多くの研究がなされている。<sup>1-4)</sup> また、古くから食用とされてきた植物で、日本食品標準成分表では野菜に分類されている。<sup>5)</sup> しかし、ヨモギは旺盛な繁殖力を持ち、容易に栽培できるにも関わらず、その食品としての利用は限られている。その中で最も一般的な食品は「ヨモギ餅」であろう。<sup>6)</sup> 我々は、ヨモギを食用野菜として広く利用する目的で、ヨモギ成分のヒト培養細胞に及ぼす作用とその抗酸化活性を測定したので報告する。

### 2 実験方法

#### 2-1 抽出方法

##### 2-1-1 ヨモギの抽出

抽出は、日本薬事法によって規定されている方法であるエタノール抽出法を用いて行った。<sup>7, 8)</sup> 抽出は、ヨモギの葉 30 g を細かく砕き、あらかじめ調製しておいた 50% エタノール水を、破碎したヨ

モギが浸る程度加え、37℃で1日静置抽出を行い、抽出液を濾別した。残渣を、再度同様の方法 (50% エタノール水) で、2回抽出を行った。その後、抽出液を合わせてロータリーエバポレーター (Iwaki Asahi Techno Glass Co., Ltd.) で、40℃で減圧濃縮を行った。さらに、濃縮液を凍結乾燥機 (Labconco Freezedry-3 NL-200) で、凍結乾燥し試料とした。

##### 2-1-2 加熱処理ヨモギの抽出

加熱処理ヨモギの抽出は、細かく磨り潰したヨモギ 30 g の加熱処理 (100℃で10分) を行った後、2-1-1と同様の方法にて抽出、抽出液の濃縮をした後、凍結乾燥を行い試料にした。

##### 2-1-3 試料液の調整

試料は水または50% エタノール水で溶解し、1-1000 ppm の濃度で測定を行った。

#### 2-2 ヒト培養細胞(OUMS-29:不死化ヒト肝細胞株)に及ぼす影響

##### 2-2-1 コロニー形成法

細胞をトリプシン処理し、浮遊細胞を作成した。次に、35 mm dish に MEM 培地 (Eagle's Minimum Essential Medium + 10% 牛胎児血清) を 5 ml 加え、浮遊細胞を 20 万個 まき 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。そして1日後、培地にヨモギ抽出物を投与し、37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で更に3日間培養を行った。その後、メタノールで細胞を固定し、5% ギムザ液で染色を行った後、コロニーを数えた。<sup>9)</sup>

##### 2-2-2 形態変化、細胞増殖、LDH 活性試験

35 mm dish に MEM 培地を 5 ml 加え、浮遊細胞を 10 万個まき 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養を行った。そして3日後、細胞コンフルエントを確認した後、ヨモギ抽出物を投与し、24 時間後、48 時間後、72 時

間後に経時的に 50  $\mu$ l の培地採取し細胞の形態観察を行った。

ヨモギ抽出物を投与後、72 時間後、細胞をクリスタルバイオレットで染色し、血球計算盤にてカウントを行った。それを投与前と比較し、細胞の増殖能を調べた。

ヨモギ抽出物を投与後、24 時間後、48 時間後、72 時間後に培地を採取し、培養液中の乳酸脱水素酵素 (LDH) 活性をラクテートデヒドロゲナーゼ C II キット (和光純薬、乳酸基質・テトラゾリウム塩法、560 nm の吸光度測定) で求めた。

## 2-3 ラジカルスカベンジング活性と酵素活性に与える影響の測定

### 2-3-1 DPPH ラジカルスカベンジング活性

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (和光純薬, DPPH) を、エタノールで溶解させ、0.15 mM に調製した。DPPH エタノール溶液と試料 500  $\mu$ l ずつを、それぞれ加えてよく攪拌した。その後、室温暗所にて 30 分反応後、517 nm の波長で吸光度を測定した。<sup>10-12)</sup> ラジカル消去活性は 試料として 50% エタノール-水を加えたものを 100% として、吸光度が 50% 減少する試料濃度で示した。

### 2-3-1 カタラーゼ (CAT) 活性に与える影響

30% 過酸化水素 (関東化学) を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈し、10 mM 過酸化水素を調製した。過酸化水素溶液 3 ml に、試料を加え、よく攪拌した。1.24 Units/ $\mu$ l の catalase [EC 1.11.1.6] を 50  $\mu$ l 加えるのと同時に、240 nm の吸光度の減少を時間変化で測定した。<sup>13)</sup> CAT 活性に与える影響は、コントロールを 1.00 として、fold で表示した。

### 2-3-3 グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) 活性に与える影響

1 mM Glutathione (reduced form) (東京化成, GSH)、0.5 mM *tert*-butyl hydroperoxide (SIGMA)、0.2 mM  $\beta$ -NADPH (SIGMA)、1 units glutathione reductase [EC 1.6.4.2] (SIGMA, パン酵母由来)、および試料を含む 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 6.5) に glutathione peroxidase [EC 1.11.1.9] (SIGMA, 牛の赤血球由来 GPx) 0.2 units を加え反応を行った。測定は、340 nm の吸光度の減少を時間変化で測定し、酵素活性を求めた。<sup>14)</sup> GPx 活性への影響は、コントロールを 1.00 として、fold で表示した。

## 2-4 統計解析

測定値は 平均値  $\pm$  標準二乗誤差 (mean  $\pm$  SE) で

表した。有意差は student t-test で行った。

## 3 実験結果

### 3-1 ヒト培養細胞を用いた毒性試験

#### 3-1-1 コロニー形成法

ヨモギの培養細胞への影響を調べるためコロニー形成法でコロニー数を測定した。ヨモギの結果を表 1 に、加熱処理ヨモギの測定結果を表 2 に示した。ヨモギを投与した細胞では、濃度依存的にコロニー形成数の減少が認められた。加熱処理ヨモギを投与した細胞では、コロニー形成数の減少が認められたものの、未処理ヨモギに比べ増加し細胞毒性の軽減が見られた。

#### 3-1-2 形態変化、細胞増殖、LDH 活性試験

ヨモギを投与後、72 時間後の Growth curve を図 1 に示す。細胞の形態変化の観察結果を図 2 - 4 に示した。培養細胞培地中の LDH 活性を表 3 に示す、ヨモギ投与による活性変化はなかった。

## 3-2 ラジカルスカベンジング活性と酵素活性に与える影響の測定

ヨモギの抗酸化活性の測定を行った結果を表 4 に示した。極めて高いラジカルスカベンジング活性を示した。CAT および GPx 活性には影響しなかった。ヨモギの活性と加熱処理したヨモギの活性値の間には著しい活性変化はなかった。

表 1 ヨモギ抽出液を添加した時の培養細胞のコロニー形成数と形成率

最終濃度	コロニー数	コロニー形成率 (%)
0 ppm	571 $\pm$ 4	100
1 ppm	49 $\pm$ 0	8.6
10 ppm	3 $\pm$ 1	0.5
100 ppm	0 $\pm$ 0	0.0

表 2 加熱処理ヨモギ抽出液を添加した時のコロニー形成数と形成率

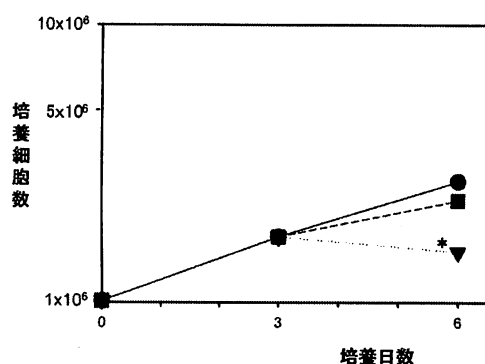
最終濃度	コロニー数	コロニー形成率 (%)
0 ppm	215 $\pm$ 4	100
1 ppm	201 $\pm$ 1	93.5
10 ppm	94 $\pm$ 9	43.7
100 ppm	16 $\pm$ 1	7.4

表3 ヨモギ抽出物を添加したときの培養液中の乳酸脱水素酵素(LDH)活性\*

	コントロール	ヨモギ抽出液 (10 ppm)
24 時間後	83.3	79.9
48 時間後	88.8	86.8
72 時間後	102	99.5

\* 単位は IU/L、25℃で測定した。

図1 ヒト培養細胞の Growth Curve



● コントロール, ▼ヨモギ抽出液 (10 ppm), ■熱処理ヨモギ抽出液 (10 ppm), \* P< 0.05.

図2 コントロールの72時間後の細胞の形態

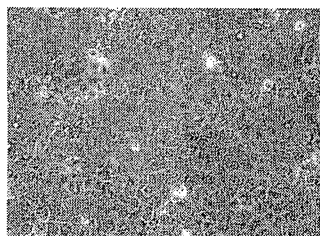


図3 ヨモギ(100 ppm)投与72時間後の細胞の形態

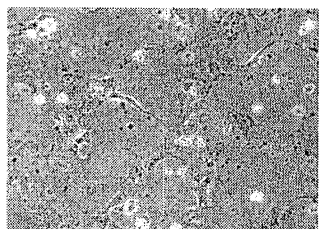


図4 加熱処理ヨモギ(100ppm)投与72時間後の細胞の形態

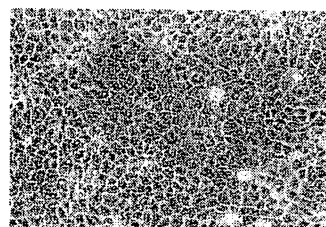


表4 ヨモギ抽出物の抗酸化活性

	ヨモギ	加熱処理ヨモギ
DPPH 活性* (ppm)	27.8	56.7
CAT 活性** (fold)	0.91 ± 0.01	1.10 ± 0.02
GPx 活性*** (fold)	0.77 ± 0.05	1.13 ± 0.48

\* DPPH ラジカルスクラビング活性は、DPPH を 50%消費する抽出液濃度で示した。 \*\*カタラーゼ活性に及ぼす影響はコントロールの活性を 1.00 として、抽出液 1000 ppm 相当での活性を fold で示した。 \*\*\*グルタチオンペルオキシダーゼ活性に及ぼす影響はカタラーゼと同様に fold で示した。

#### 4 考察

ヒト培養細胞を用いて、ヨモギを 50%エタノール水で抽出した抽出液が培養細胞に及ぼす作用を調べた。細胞の増殖を感度良く測定するコロニー形成法<sup>15)</sup>でコロニー数が減少し、細胞の増殖抑制が認められた。ヨモギ抽出液により細胞の形態変化が認められたので、培養液中に遊出した LDH 活性を測定したが、増加は見られなかった。このことから、ヨモギの作用は細胞膜破壊ではなく細胞増殖抑制であると推測された。細胞の形態変化を起こした細胞を、新しい培地に移して再度培養を行ったところ、細胞数の増加は見られず形態変化も回復しなかったことから、細胞形質変化を起こした可能性も考えられた。続いて、加熱処理(調理)をしたヨモギの抽出液を加えて培養したときは、細胞増殖が一部回復した。このことから、ヨモギ成分中の細胞増殖抑制もしくは細胞形質変化を起こす化合物は、熱に不安定な化合物、タンパク質である可能性が推定された。ここで、この化合物が未処理のヨモギにあることを確認するために、加熱時間を 0 分、10 分、20 分、30 分と変化させて行ったヨモギから抽出液を作成し、100 ppm 濃度で 72 時間培養して調べた所、加熱時間の増加により、細胞形態変化が減少し、細胞増殖の回復が見られた(図 5-9)。

抗酸化活性では、ヨモギ抽出液は強い DPPH ラジカ

ルスカベンジング活性を示したが、抗酸化酵素 (CAT と GPx) 活性にはほとんど影響しなかった。また、この DPPH ラジカルスカベンジング活性はヨモギを加熱処理してもわずかに変化しなかったことから、ヨモギに含まれる抗酸化化合物と細胞に作用する化合物とは異なること、ヨモギは加熱処理 (調理) することにより細胞への作用が弱まり高いスカベンジング活性を持つ有望な食材になることが示唆された。これらの結果は、ヨモギがこれまで主として「ヨモギ餅」として食用に供せられていることと一致している。現在、ヨモギ成分中のこれらの活性化化合物の分離を行っている。

図 5 コントロールの 72 時間後の細胞形態

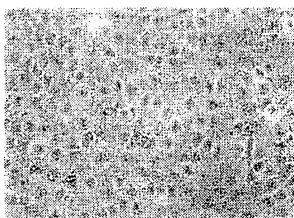


図 6 72 時間後の細胞形態 + ヨモギの抽出液

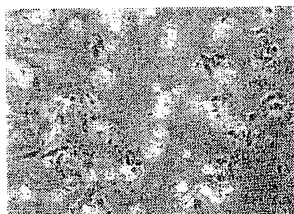


図 7 72 時間後の細胞形態 + 10 分加熱処理したヨモギの抽出液

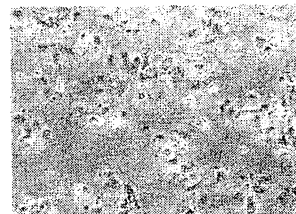


図 8 72 時間後の細胞形態 + 20 分加熱処理したヨモギの抽出液

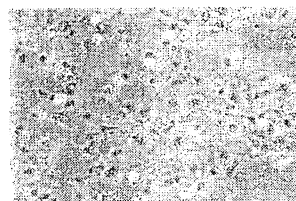
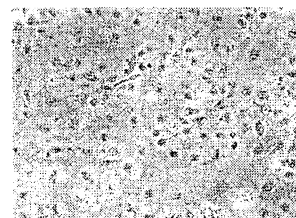


図 9 72 時間後の細胞形態 + 30 分加熱処理したヨモギの抽出液



## 5 謝辞

本研究を行うにあたりヒト培養細胞 (OUMS-29) を供与下さいました新見公立短期大学学長難波正義教授に感謝いたします。また、本研究の一部は 文部科学省学術高度化推進事業「社会連携研究推進事業」岡山理科大学「地域社会とのコラボレーションによる QOL 向上の一体的アプローチ」研究の一環として行なった。

## 参考文献

- 1) 木村康一、木村孟淳; 原色日本薬用植物図鑑 p 223-224 保育社、大阪 (1996)
- 2) Hayashi T, Hayakawa Y, Hayashi T, Sasaki H, Sakuragawa; Sulfated polysaccharides from the leaves of *Artemisia princeps* activates heparin cofactor II independently of the Lys 173 and Arg 189 residues of heparin cofactor II. *Thromb. Res.*, 87(1), 105-112 (1997).
- 3) Oda R; The advantages and disadvantages of *Artemisia princeps* and *A. Montana*. *Yakugaku Zasshi*, 35(1), 55-62 (2000)
- 4) Hitosugi N, Ohno R, Hatsukari J, Mizukami S, Nagasaka H, Matsumoto I, Komatsu N, Fujimaki M, Nakashima H, Satoh K, Sakagami H; Diverse biological activities of moxa extract and smoke. *In Vivo*, 15(3), 249-254 (2001)
- 5) 食品成分研究調査会編; 五訂増補 日本食品成分表 第2版 医歯薬出版、東京 (2006)
- 6) 渡部忠世、深澤小百合; 草餅と菱餅、もち(糯・餅), p. 255-257 法政大学出版局、東京 (1998)
- 7) 東京都健康局、東京都生活文化局; 健康食品取扱マニュアル, p. 6 - 231. 薬事日報社、東京 (2000)

- 8) 鈴木郁生, 野島庄七, 谷村顕雄; 食品添加物公定書解説書, 7, p. E1 - F30. 廣川書店, 東京 (1999)
- 9) 松谷豊; 動物細胞培養入門 学会出版センター, 東京 (1993)
- 10) Tominaga H, Kobayashi Y, Goto T, Kasemura K, Nomura M; DPPH radical-scavenging effect of several phenylpropanoid compounds and their glycoside derivatives. *Yakugaku Zasshi*, 125, 371- 375 (2005)
- 11) Kumar SS, Priyadarsini KI, Sainis KB; Free radical scavenging activity of vanillin and  $\sigma$ -vanilin using 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH) radical. *Redox Report*, 7, 35-40 (2002)
- 12) Aniya Y, Koyama T, Miyagi C, Miyahira M, Inomata C, Kinoshita S, Ichiba T; Free radical scavenging and hepatoprotective action of the medicinal herb, *Crassocephalum crepidioides* from Okinawa Islands. *Biol Pharm Bull*, 28, 19 - 23 (2005)
- 13) Aebi HE; Catalase. In: *Methods of enzymatic analysis* (Bergmeyer HU, eds), third edition, vol 3, p. 273- 286. Weinheim: Verlag Chemie (1983)
- 14) Wendel A; Glutathione peroxidase. *Methods Enzymol*, 77, 325-333 (1981)
- 15) Kosaka T, Fukaya K, Tsuboi S, Pu H, Ohno T, Tsuji T, Namba M; Comparision of various methods of assaying the cytotoxic effects of ethanol on human hepatblastoma cells (HUH-6 line). *Acta Medica Okayama*, 50(3), 151-156 (1996).

## Effects of *Artemisia princeps* (yomogi) extract on human cultured cells and the antioxidant activities

Noriyoshi MASUOKA, Hideki KAWANISHI\*, Sumiko TANAKA\*,

Kohji ISHIIHARA and Hiroki HAMADA

*Department of Life Science, Faculty of Science*

*\*Graduate School of Science, Faculty of Science*

*Okayama University of Science*

*1-1 Ridai-cho, Okayama 700-0005, Japan*

(Received September 13, 2006; accepted November 6, 2006)

Leaves of *Artemisia princeps* (yomogi) were extracted with 50 % aqueous ethanol solution. Effects of yomogi extract on human cultured cells (OUMS-29) were examined. Growth of the cells is strongly inhibited by the addition of the extract. Though deformation of the cells was observed, it was assigned that the inhibition of cell growth was not due to enhancement of the cell degradation but due to inhibition of the cell division. When yomogi was treated with heating, inhibitory effect of the extract on cell growth was decreased. Antioxidant activities of yomogi extract were also examined. Scavenging activity of yomogi extract for DPPH radical was high and slightly reduced with heat treatment of yomogi. These results indicate that heat-treated yomogi is an excellent food stuff having a high antioxidant activity *in vitro*.

**Keywords:** *Artemisia princeps*; human cultured cell; cell growth; heat treatment; antioxidant activity.